

④日本国特許庁 (JP) ④特許出願公開  
 ④公開特許公報 (A) 昭60-172291

④Int.Cl.  
 C 12 P 7/52  
 (C 12 P 7/52  
 C 12 R 1:145)

識別記号 庁内整理番号  
 8213-4B

④公開 昭和60年(1985)9月5日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

④発明の名称 イソ酸酸の製造方法

④特 許 昭59-28558  
 ④出 願 昭59(1984)2月20日

④発 明 者 井 上 栄 一 鎌路市網干区新在家940  
 ④発 明 者 河 田 直 紀 鎌路市余部区上余部500  
 ④発 明 者 鹿 山 貞 夫 鎌路市安田3-108-1  
 ④出 願 人 工 楽 技 術 院 長

明細書

1. 発明の名称

イソ酸酸の製造方法

2. 特許請求の範囲

二酸化炭素と水素を基質として用いて、クロストリクウム菌に属し二酸化炭素と水素を酸化してイソ酸酸を生産する能力のある菌を培養し、生成されたイソ酸酸を回収する事を特徴とするイソ酸酸の製造方法

3. 発明の詳細な説明

(背景上の利用分野)

この発明は、クロストリクウム菌に属する菌を用いて二酸化炭素と水素とからイソ酸酸を製造する方法に関するものである。イソ酸酸は香料原料など合成化学の分野で用いられている。

(従来技術)

二酸化炭素と水素とを酸化して、生育培地中に酸を蓄積する微生物はいくつか知られている。そのなかでクロストリクウム菌に属する菌は4種あるが、これらが二酸化炭素と水素とからイソ酸

酸を生産することは知られていない。

菌類を酸化してイソ酸酸を製造する能力のある菌も知られており、クロストリクウム菌に属する菌としてはクロストリクウム・スティクランディ、クロストリクウム・プロビオニカム、クロストリクウム・ゴーニなどがあるが、これらは二酸化炭素と水素を基質とするものではない。

(発明の目的)

本発明者は、再生可能な資源であり自然界におびただしく存在しあつ各種産業の基盤の農業物でもある二酸化炭素に着目し、これを将来の有力なエネルギー源として考えられている水素と反応させることにより、生化学的にカルボン酸を創造する方法を検討しこの発明に到達した。上記のような菌が知られているものの、二酸化炭素と水素とからのカルボン酸の創造を工業的に実施するためには、解決すべき課題はまだ多く、特に二酸化炭素と水素とを基質としてイソ酸酸を製造する能力のある菌はまだ確立されていない。

本発明者はこのような事情のもとに、二酸化炭

素と水素を基質とするイソ菌類の斬新な製造方法を提供することを目的とする。

(発明の構成)

本発明は二酸化炭素と水素を基質として用いて、クロストリクウム属に属し二酸化炭素と水素を質化してイソ菌類を生産する能力のある菌を培養し、生成菌類を回収する事を特徴とするイソ菌類の製造方法である。

本発明で用いられる微生物はクロストリクウム属に属し二酸化炭素と水素を質化するイソ菌類生産菌であり、この様な微生物は本発明実施例記載のものがはじめてである。実施例で用いられた微生物は嫌気性菌で孢子を作る桿菌である点でクロストリクウム属に属する菌であると考えられるが、二酸化炭素と水素で成育し、鞭毛のないことなど、後で詳しく記す性質において公知の異常菌と相違しており、新菌種であると考えられる。正式の種名はまだ付されていないので、本発明ではクロストリクウム・エスピ- No. 68-2と表示する。

次にクロストリクウム・エスピ- No. 68-2

特開昭60-172291(2)

(以下本願と略記す) の製造法および菌学的性質を示す。

(製造法)

本願は大阪府の大和川の川底泥より下記の方法により分離した。すなわち第1表に示す液体培地5mlを試験管へ分注し培養後、嫌気グローブボックス内で約0.3日の土壌を添加し、アチルゴム袋で密栓後、気相を水素(67%)と二酸化炭素(33%)を含む除菌ガスに置換し、30℃で5日培養し、約3週間毎に植え替を行つた。2回液体培地で植え替いだのち、第1表の培地に毎天3%を加えた寒天培地を用いてロールチューブ法(メソッズ・イン・マイクロバイオロジー、3号B、117頁(1969)アカデミック・プレス)により單菌分離し本願を得た。

(菌学的性質)

本発明の菌株の菌学的性質を示す。この菌学的性質の検討には、「アンアエロバ・ラボラトリーマニュアル(Anaerobe Laboratory Manual)第4版」(The V.T.P. Anaerobe Laboratory Virginal

a Polytechnic Institute and State University, Blacksburg(1972)」および「バーグース・マニユアル・オブ・デターミニティップ・バクテリオロジー(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)第8版」「微生物の分類と同定」(長谷川武治著、学会出版センター)に記載されている方法、培地組成を用いた。

(顯微鏡的所見)

1. 菌體の形および大きさ: 単胞もしくは2連の直球菌。幅1.3-1.6μm、長さ4.5-4.8μm
2. 鞭毛: なし
3. 孢子: あり、ターミナル
4. グラム染色: 隣性

(培地組成)

第1表に例示する。

第1表

基本培地の組成(脱イオン水1L中)	
0.1%レザゼリン	1ml
10%NH <sub>4</sub> Cl	10ml
1MKH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH7.0)	5ml
20%MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5ml
ビタミン溶液	20ml
ミネラル溶液	40ml
システィン塩酸(1水塩)	0.5g
Na <sub>2</sub> S	0.25g
NaHCO <sub>3</sub>	100
0.06%プロムエタンスルホン酸ナトリウム1ml	
豚肉エキス	0.2g
ビタミン溶液組成(mg/l)	
ビオチン	2
葉酸	2
ピリドキシン塩酸	10
チアミン塩酸	5

## 特開昭60-172291(3)

リボラビン	5
ニコチン酸	5
バントテン酸Ca	5
ビタミンB12	0.01
ローアミノ安息香酸	5
チオクト酸	1
<b>ミネラル濃度組成 (g/l)</b>	
ニトリロ3酢酸	0.25
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.28
NaCl	0.5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05
CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.08
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.07
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.08
CuSO <sub>4</sub>	0.03
Al <sub>2</sub> K(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.009
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	0.005
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.006

## (生育状態)

第1表の組成に3%寒天を加えた寒天培地で生育は次の通りである。

形状：円形

周縁：円滑

隆起：わずかに盛上る

表面：円滑

色調：白

## (生理的性質)

①. 色素に付する濃度：無性嫌気性

②. 生育の範囲 (pH) 至適pH: 7.7

生育pH: 5.5~8.0

(温度) 至適温度: 30°C

生育温度: 25~40°C

③. インドール産生: +

④. セラチンの消化: -

⑤. カタラーゼ産生: -

⑥. テンブンの加水分解: -

⑦. エスクリンの加水分解: -

⑧. 色素の生成: -

## (炭素源の質化性)

第1表の基本培地に下記炭素源 (1%) を含む液体培地5mlを直径18mmの試験管に加え、加熱培地を作成し本菌を播種し気相を窒素 (67%) と二酸化炭素 (33%) を含む除菌ガスに置換し、30°Cで14日間の置換後した。生育は600nmの吸収を分光計 (スペクトロニック20、島津製作所製) で測定した。600nmの吸収が炭素源を含まないコントロールとの差が0.1未満のものを「質化しない」、0.1以上0.2未満のものを「わずかに質化する」、0.2以上のものを「質化する」とした。

質化するもの：グルコース、フラクトース、キシロース、リボース、アラビノース、ラムノース、ガラクトース、マルトース、シュクロース、ラクトース、メリゼオース、トレハロース、セロビオース、ラフィノース、メレクトース、マンニトール

また上記の試験において質素の代りに水素を用いた場合は二酸化炭素も質化する。

質化しないもの：ソルボース、ソルビトール、

メタノール、エタノール

## (糖などからの糖の生成)

第1表の基本培地に上記の試験で質化することが確かめられた糖を1%添加し、気相を窒素 (67%) と二酸化炭素 (33%) を含む除菌ガスに置換し、本菌を播種、30°Cで14日間培養した。すべての炭素源において培地中には有酸性として酵酸とイソ酵酸が生成された。

またペプトン・酵母エキス培地またはペプトン・酵母エキス・グルコース培地を用いた場合も培地中には有酸性として酵酸とイソ酵酸が生成された。

## (在米の類似種との比較など)

上記の菌学的性質から、B0.68-2は、無性嫌気性のグラム陰性有酸性桿菌で、その主要代謝産物が酵酸とイソ酵酸であることを特徴とする菌株である。この性状からバーカーズ・マニアル・オブ・データーミネイティブ・バクテリオロジー第8版及びアンアエロブ・ラボラトリー・マ

## 特開昭60-172291(4)

ニュアル第4版にもとづく検査するとクロストリックウム (*Clostridium*) に属する菌株であると考えられる。そこでアンエロブ・ラボラトリ・マニュアル第4版で菌の固定のキーに従って固定していくとクロストリックウム・スフェノイデス (*C. sphenoides*) に行きあたる。またバーワーズ・マニュアル・オブ・データーミネイティップ・バクテリオロジー第8版には諸性状が No. 68-2 と一致する菌種の記載はなかった。No. 68-2 とクロストリックウム・スフェノイデスの性状を比較したところ共に墨縫気性のグラム陰性有胞子桿菌である点で一致したが、第2表に示す点で両菌の性状は違っていた。本発明の菌株は、二酸化炭素と水素で成育して酸素とイソ酸を生ずる。クロストリックウム属に属する菌で二酸化炭素と水素で成育する菌は4種知られていたが、これらはすべて鞭毛を有し、また1種以外はグラム染色陽性である点で本発明とは区別できるものであった。

第2表

C・スフェノイデス (文献値)	No. 68-2 (実験値)
形態: くさび形桿菌	桿菌
單数もしくは2連	單数もしくは2連
鞭毛あり	鞭毛なし
大きさ: 0.3~0.5 (μm) × 1.6~6.7	1.3~1.8 × 4.5~4.8
グラム染色: 陰性	陰性
色素生産: なし	なし
炭素源質化性	
リボース質化性: なし	よく質化する
メリビオース質化性: なし	よく質化する
メレクトース質化性: なし	よく質化する
生産物: 酸素の他にエタノール、 イソ酸の他にイソ酸と アロバノールを生産する	イソ酸の他にイソ酸と アロバノールを生産する

以上のことから、本菌株はクロストリックウム属に属する新菌種であると考えられるので、クロストリックウム・エスピ - No. 68-2 と命名した。

さらにこの菌株は工業技術院微生物工業技術研究所に「農工研菌育第7367号 (FERM-P No. 7367) として寄託した。

## (培養方法)

培養方法は原則的には、一般の微生物の組合と同様であるが、酸素の混入を防ぐことが必要であり、実験室的には、ゴム栓等で密栓した培養器内で、静置あるいは振盪する方法が用いられる。やや大きい菌株では、通常用いられる振盪器がそのまま利用でき、振盪内の酸素は、窒素などの不活性ガスあるいは酸素ガスなどで置換することにより無気的な雰囲気をつくることが可能である。振盪器の形式は特に固わないが、普通に使用される製作組合機のほか、一段あるいは多段の気泡塔型、ドラフトチューブ型の振盪器も利用できる。

培養に用いる炭素源は、通常、二酸化炭素ガスとして供給するが、培養中に溶解二酸化炭素あるいは炭酸ガス、炭酸水素塩として加えることもできる。炭素源は酸化アンモニウムのごときアンモニウム塩や硝酸ソーダのような無機塩のごとく、過

常の濃度に用いられる各種の炭素化合物を用いることができる。

その他の必要に応じ、リン酸二水素カリ、硫酸マグネシウム、硫酸マンガン、塩化ナトリウム、硫酸鉄、硫酸コバルト、塩化カルシウム、硫酸亜鉛、硫酸銅、明礬、モリブデン酸ソーダ、硫酸などの無機化合物、あるいはビオチンや酵母エキスなどのビタミン類を添加することは、通常行なわれる通りである。

以下具体例により本発明を説明する。

## 実験例 1

クロストリックウム・エスピ - No. 68-2 株を以下のように培養した。第1表に示す培地を試験管へ 5 ml 分注培養後、肉培地で培養を行つた培養液 100 ml を螺旋グローブボックス (ファーマ社、アナエロボックス) 中で添加し、ブチルゴム栓で密栓したのち気泡を水素 (6.7%) と二酸化炭素 (3.3%) を含む除菌ガスに置換し、30℃で静置培養した。

培養液の一部を遠心分離器により固体を分離し、

## 特開昭63-172291(5)

この上部をリン酸で酸性にして、ガスクロマトグラフィーにより生成物の定量を行なった。

その結果、回収率10日間で0.280/1の回収と0.480/1のイソ酸を生成していた。(生成物の確認はガスクロマトグラフ-質量分析計によった。)

## 実験例2

L字型試験管を用い、実験例1と同様に取扱してクロストリクム・エスピード68-2液の回収率を測定した。測定方法も実験例1と同様に行ない生成物を分析した結果10日間で0.420/1の回収と0.520/1のイソ酸を生成していた。

特許申請人 工業技術院長